

КАРИОПАТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭКСТРАКТА *Fasciola hepatica* НА ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ

Е.В. КРАСНИКОВА

соискатель

Т.Н. СИВКОВА

доктор биологических наук

Пермская государственная сельскохозяйственная академия
им. акад. Д.Н. Прянишникова,

e-mail: Viki-eva1002@rambler.ru, tatiana-sivkova@yandex.ru

Изучено воздействие экстракта трематод *Fasciola hepatica* на клетки организма лабораторных мышей. Очищенный экстракт фасциол однократно внутрибрюшинно вводили нелинейным белым мышам-самцам в дозе 100 мкг белка. Проведен учет количества лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов. Мазки крови и мазки-отпечатки красного костного мозга и семенников окрашивали по Романовскому и микроскопировали. Определяли митотический индекс и подсчитывали число патологических фигур митоза. Установлено, что однократное внутрибрюшинное введение лабораторным белым мышам соматического экстракта *F. hepatica* повышает число анэуплоидных клеток в красном костном мозге, а также стимулирует выработку лимфоцитов и эозинофилов. Полученные результаты подтверждают способность гельминтов вызывать нарушения процесса деления клеток в организме хозяина.

Ключевые слова: фасциолез, соматический экстракт, клетки крови, костный мозг, митоз.

Влияние гельминтов на организм хозяина является предметом многих исследований, которые позволили установить трофическое, аллергическое, а также их токсическое действие [1]. Также в последние годы установлено, что паразиты оказывают генотоксическое воздействие на ядерные структуры клеток человека и животных [2, 3, 5, 6, 9]. Установлено, что кариопатические изменения происходят не только в результате экспериментального или спонтанного заражения, но и при иммунизации метаболитами паразитов [2, 3, 5].

Одной из самых распространенных паразитарных болезней во всем мире остается фасциолез. Большинство ученых констатируют масштабное распространение фасциолеза в странах СНГ [4, 7, 8]. В Пермском крае по данным Пермской СББЖ зараженность фасциолезом крупного рогатого скота составляет 3,8, мелкого рогатого скота 3,0 %. У жвачных животных это заболевание обуславливает тяжелые органические нарушения; снижает молочную, мясную и другие виды продуктивности [1, 8]. В связи с этим представляет интерес изучение воздействия экстракта *Fasciola hepatica* на клетки организма хозяина.

Материалы и методы

Половозрелые *F. hepatica* получали из печени спонтанно зараженных овец во время проведения ветеринарно-санитарной экспертизы. Выделенных

трематод обрабатывали стерильным физиологическим раствором с добавлением антибиотика, гомогенизировали методом многократного замораживания и оттаивания, затем растирали в ступке с кварцевым песком и экстрагировали фосфатно-солевым буферным раствором в течение 24 ч при температуре 4 °С. Экстракт очищали центрифугированием при 15000 оборотов в минуту.

Очищенный экстракт фасциол однократно внутрибрюшинно вводили нелинейным белым мышам-самцам массой 18–20 г в дозе 100 мкг белка. Контрольная группа животных оставалась интактной. Убой мышей проводили через 4, 12, 24, 48 и 72 ч методом цервикальной дислокации [10]. 200 мкл венозной крови собирали в одноразовые пластиковые пробирки с ЭДТА-К2 и исследовали с помощью автоматического гематологического анализатора Abacus junior vet. Учитывали следующие показатели: лейкоциты, лимфоциты в процентном соотношении, моноциты, гранулоциты.

Также готовили мазки крови и мазки-отпечатки красного костного мозга и семенников, которые окрашивали по Романовскому и микроскопировали. Определяли митотический индекс (%) и подсчитывали число патологических фигур митоза.

Результаты и обсуждение

Общее состояние контрольных и опытных животных оставалось удовлетворительным на протяжении всего периода эксперимента. Результаты изменения митотической активности и количества патологий деления клеток, и изменения показателей периферической крови представлены в таблице 1.

1. Показатели периферической крови мышей после введения соматического экстракта *F. hepatica*

Показатель	Контроль	Значение показателя после введения экстракта, ч				
		4	12	24	48	72
Лейкоциты	4,50±0,03	3,88±0,65	3,56±0,65	7,12±0,59	3,47±0,06	4,94±0,65
Палочкоядерные нейтрофилы	1,40±0,34	2,50±0,05	6,00±0,70	0,50±0,05	3,0±0,00	1,20±0,34
Сегментоядерные нейтрофилы	35,80±0,87	35,00±0,87	27,50±0,85	40,50±0,87	27,30±0,83	34,80±0,58
Эозинофилы	3,20±0,29	1,00±0,81	4,00±0,82	4,50±0,83	6,30±0,59	0,40±0,84
Базофилы	0,20±0,05	0,50±0,59	0	0	0	0
Лимфоциты	58,60±0,55	58,00±0,57	61,05±0,87	54,50±0,58	61,60±0,84	63,20±0,89
Моноциты	0,80±0,29	2,50±0,42	1,00±0,43	0,00	1,60±0,47	0,40±0,15

Примечание. $P \leq 0,05$.

В результате проведенных исследований установлено уменьшение числа лейкоцитов через 4, 12, 48 ч и повышение в 1,5 раза через 72 ч. Изменялось и соотношение лейкоцитов. Процентное соотношение лимфоцитов в начале опыта отклонялось от контрольных показателей, однако через 24 ч их число уменьшилось на 4, а через 72 ч увеличилось на 5 %. Число эозинофилов оказалось выше контроля в 3 раза через 4 ч и в 2 раза через 48 ч, что связано с аллергенным действием белков экстракта. Число нейтрофилов на 8 % было ниже через 12 и 48 ч, а через 24 ч – выше на 4,7 %. Таким образом, на фоне общего незначительного снижения числа лейкоцитов отмечено увеличение содержания лимфоцитов и эозинофилов, что свидетельствует об активации иммунных процессов и аллергизации организма.

При изучении лейкограмм экспериментальных мышей отмечали изменения в соотношении клеток крови. Так, из-за воспалительной реакции, вызванной экстрактом *F. hepatica*, в организме мышей через 12 ч повысилось число палочкоядерных нейтрофилов в 2,4 раза, а через 24 ч увеличилось чис-

ло сегментоядерных нейтрофилов в 1,4 раза. Также через 12 ч увеличилось число эозинофилов на 0,8, и в дальнейшем этот показатель повышался, и через 48 ч увеличился в 3,1 раза по сравнению с контролем. Это свидетельствует об активации иммунных процессов после введения экстракта и развитии аллергической реакции.

Число лимфоцитов во всех группах было по сравнению с нормой незначительно ниже, но через 72 ч поднялось до уровня нормы. При микроскопии мазков периферической крови были обнаружены такие патологии как двух-ядерные лимфоциты и бластные формы.

Изменение состояния клеток красного костного мозга подтверждает антимитотический эффект экстракта *F. hepatica* (табл. 2).

2. Частота кариопатических последствий в костном мозге и семенниках мышей после введения экстракта *F. hepatica*

Показатель	Контроль	Значение показателя после введения экстракта, ч				
		4	12	24	48	72
Митотический индекс в красном костном мозге, %	0,27±0,10	0,11±0,06	0,21±0,05	0,41±0,21	0,69±0,23	0,55±0,21
Патологии митоза в красном костном мозге, %	0,02±0,02	0	0,05±0,05	0,10±0,01	0,16±0,06	0,08±0,01
Митотический индекс в семенниках, %	28,38±0,18	38,95±3,25	23,10±1,53	27,87±1,37	34,25±3,55	28,84±0,30
Патологии митоза в семенниках, %	0,30±0,005	0,55±0,15	0,40±0,40	1,09±0,71	0,75±0,35	1,34±0,07
Трехполосная анафаза	0,005 ± 0,0003	0	0	0,26 ± 0,1375	0	0,24 ± 0,019
Преждевременное расхождение хромосом в метафазе	0,005 ± 0,0004	0,015 ± 0,0225	0,005 ± 0,0075	0,53 ± 0,275	0,3 ± 0,2	0,58 ± 0,062
Отставание хромосом в метафазе	0,006 ± 0,0005	0	0,025 ± 0,375	0	0	0,2 ± 0,025
Неравнополосная анафаза	0	0	0,005 ± 0,0075	0	0	0,02 ± 0,02
Преждевременное расхождение хромосом в анафазе	0	0	0,20 ± 0,20	0	0,05 ± 0,075	0,02 ± 0,02
Анафаза с мостом	0	0	0,00	0	0,05 ± 0,075	0,02 ± 0,02
Многоядерные клетки, %	0	0	0,00	0	0,00	0,04 ± 0,01

Примечание. $P \leq 0,05$.

Как видно из таблицы, костный мозг начинал реагировать на введение экстракта фасциолы через 24 ч после внутрибрюшинного введения. Максимальное количество изменений регистрировали через 48 ч в 2,5 раза, через 72 ч в 2 раза. Количество патологических митотических фигур регистрировали через 24 и 48 ч (в 5 и 8 раз соответственно). Наиболее часто среди нарушений деления клеток красного костного мозга встречались такие патологии как многополосный митоз, неравнополосный митоз, хромосомный мост в анафазе (рис.). Данные патологии приводят к неравномерному распределению хромосом в дочерних клетках и анеуплоидии.

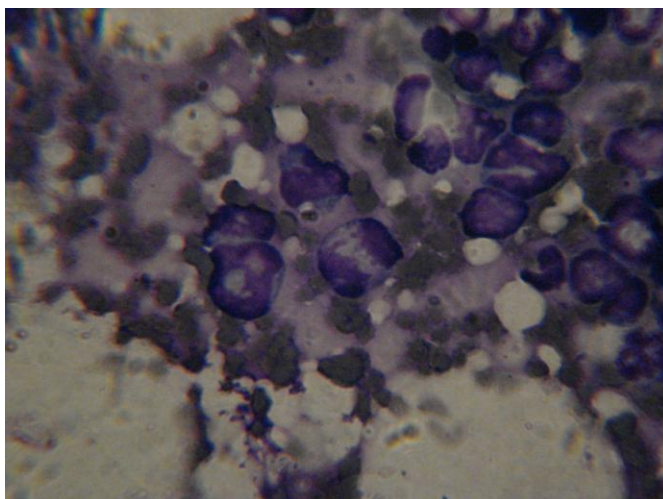


Рис. Костный мозг. Анафаза с отставанием хромосом
(увел. $\times 1000$, окраска по Романовскому–Гимза)

Под влиянием белков *F. hepatica* происходит нарушение деления сперматогенного эпителия, повышение митотического индекса в 1,5 раза отмечаем через 4;48 часов. Значительное количество патологических фигур деления регистрировали через 24 ч (в 3,3 раза), через 48 ч (в 2 раза) и через 72 ч (в 4,5 раза). Среди патологических фигур деления наиболее часто встречались трехполюсная анафаза и преждевременное расхождение хромосом в метафазе. Полученные в ходе нашего эксперимента данные подтверждают отрицательное влияние продуктов метаболизма гельминтов на половые клетки хозяина.

Таким образом, наши исследования подтверждают способность гельминтов вызывать нарушения процесса деления клеток в организме хозяина. Соматический экстракт *F. hepatica* при внутрибрюшинном введении лабораторным мышам вызывает появление анеуплоидных клеток в красном костном мозге и семенниках, вызывает снижение количества лейкоцитов периферической крови и является активным антигеном и аллергеном, стимулируя лимфоцитарную и эозинофильную субпопуляции клеток крови.

Литература

1. Akbaev M.Sh., Vodjanov A.A., Kosminkov N.E. Parazitologija i invaziонnye bolezni zhivotnyh. – М.: Kolos, 1998. – 743 s.
2. Bekish O.-Ja.L. Bekish V.Ja., Pobjarzhin V.V. Genotoksicheskie i citotoksicheskie jeffekty v organizme hozjaina pri gel'mintoznyh invazijah // Dostizhenija medicinskoj nauki Belorussii. – 2006.
3. Bekish V.Ja., Malyshev I.Ju. Vozdejstvie metabolitov migrirujushhih lichinok askarid na nasledstvennyj apparat spermatogoniev i spermatocitov hozjaina // Mater. 11 konf. mol. uch. Rossii «Fundamental'nye nauki i progress klinicheskoy mediciny». – М., 2001. – Том 22. – S. 127.
4. Vasil'eva V.A. Jepizootologicheskaja situacija fascioleza крупного rogatого skota v Rossijskoj Federacii // Estestvoznание i gumanizm. – 2008. – Т. 5, Vyp. 1. – S. 23–26.
5. Il'inskih I.N., Novickij V.V., Il'inskih E.N. i dr. Infekcionnaja kariopatologija / Pod red. N.N. Il'inskih. –Tomsk: Izd-vo Tom. un-ta, 2005. – 168 s.
6. Kalinin L.V. Vlijanie trihinelleznoj invazii i metabolitov trihinell na hromosomnyj apparat somaticheskikh kletok hozjaina: Avtoref. dis. ... kand. med. nauk. – Vitebsk, 1995. – 19 s.

7. *Kolesnikova M.A.* Issledovanie geograficheskikh informacionnyh sistem dlja jepizootologicheskikh prirodnyh izotopov fasciol // Veterinarija. – 2008. – № 6. – S. 35–38.
8. *Kumysheva Ju.A.* Fasciolez krupnogo rogatogo skota i ego vlijanie na fiziiko-himicheskie pokazatele produktov uboja: Avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. – M., 2009. – 24 s.
9. *Maksimenko S.N.* Vlijanie nematodoznoj invazii na mitoz, antimitoticheskoe dejstvie i biotransformaciju albendazola u laboratornyh zhivotnyh: Avtoref. dis. ... kand. vet nauk. – M., 2008. – 23 s.
10. *Sivkova T.N.* Poluchenie i hranenie antigenov gel'mintov. – Perm': Izd-vo FGOU VPO Permskaja GSHA, 2009. – 14 s.
11. *Sheljakin I.D.* Antioksidantnaja zashhita krupnogo rogatogo skota pri fascioleze // Veterinarija. – 2008. – № 4. – S. 27–29.

**Caryopathic effect of extract *Fasciola hepatica*
on laboratory mice**

E.V. Krasnikova
candidate

T.N. Sivkova
doctor of biological sciences

*Perm State Agricultural Academy
named after Academician D.N. Pryanishnikov,
e-mail: Viki-eva1002@rambler.ru, tatiana-sivkova@yandex.ru*

Effect of extract of trematodes *Fasciola hepatica* on body cells of laboratory mice is studied. A single intraperitoneal injection of rectified extract of fascioles was made into non-linear white male mice at the dose of 100 mg/kg of extract enzyme. The total number of leucocytes, lymphocytes, monocytes and granulocytes has been registered. Blood films as well as red bone marrow- and seminal vesicles smears were stained using a Romanowsky-type stain and microscopied. Mitotic index was determined and number of abnormal mitotic figures calculated. It is found that a single intraperitoneal injection of rectified extract *F. hepatica* into non-linear white male mice increases the number of aneuploid cells of red bone marrow as well as stimulates production of lymphocytes and eosinophils. The received results confirm the ability of helminths to cause the host cell mitotic disturbances.

Keywords: fascioliasis, somatic extract, blood cells, bone marrow, mitosis.